



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Área de Nutrición y Bromatología

**Departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología,
Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia**

**MÁSTER DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD:
FARMACOLOGÍA, NEUROBIOLOGÍA Y NUTRICIÓN**

TRABAJO FIN DE MASTER

**Medida de los fenoles totales y de la
capacidad antioxidante y antirradicalaria
de los hongos comestibles *Marasmius
oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota
procera* y su degradación a diferentes
tiempos y temperaturas.**

Presentado por ***Silvia Gómez Herrador*** para optar al grado de
Máster por la Universidad de Valladolid

Dirigido por: D^a. María del Pilar Jiménez López y
D. Tomás Girbés Juan

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y Dña. Pilar Jiménez López, Profesora de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de este Trabajo Fin de Máster, certifican que el trabajo realizado por D^a. Silvia Gómez Herrador puede ser presentado como Trabajo Fin de Máster en Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 30 de junio de 2014

Fdo.: Tomás Girbés Juan

Fdo.: Pilar Jiménez López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a los profesores Tomás Girbés y Pilar Jiménez por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su Departamento así como a los compañeros del laboratorio José-Ezequiel Basterrechea (Joseba) y Jesús Tejero por sus constantes enseñanzas y consejos.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Características generales de los hongos	7
1.2. Características macroscópicas de los hongos	7
1.3. Características microscópicas de los hongos	9
1.4. Propiedades nutricionales y medicinales de las setas	10
1.5. Importancia económica y biológica de las setas	11
1.6. Descripción y clasificación científica de los hongos sometidos a estudio.....	12
1.7. Efecto antioxidante y radicales libres	15
1.8. Componentes fenólicos	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Material de laboratorio	22
3.1.1. Equipos.....	22
3.1.2. Material fungible	22
3.1.3. Reactivos químicos	23
3.1.4. Material biológico.....	23
3.2. Obtención de los extractos	24
3.3. Método de Folin-Ciocalteu	26
3.4. Método de CUPRAC.....	27
3.5. Método del radical DPPH.....	28
4. RESULTADOS	30
4.1. Volúmenes de los extractos crudos de setas	31
4.2. Medida de los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	32
4.3. Medida de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC.....	34
4.4. Medida de la capacidad antirradicalaria. Método del DPPH	36
4.5. Resultados para la muestra de <i>Marasmius oreades</i>	38

4.5.1. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los compuestos fenólicos	38
4.5.2 Medida de la degradación de los compuestos fenólicos a diferentes temperaturas durante un tiempo de 30'	43
4.6. Resultados para la muestra de <i>Lactarius deliciosus</i>	46
4.6.1. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los compuestos fenólicos	46
4.6.2 Medida de la degradación de los compuestos fenólicos a diferentes temperaturas durante un tiempo de 30'	48
4.7. Resultados para la muestra de <i>Macrolepiota procera</i>	50
4.7.1. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los compuestos fenólicos.....	50
4.7.2 Medida de la degradación de los compuestos fenólicos a diferentes temperaturas durante un tiempo de 30'	53
5. DISCUSIÓN	56
6. CONCLUSIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA.....	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de los hongos

Los hongos son todos aquellos seres vivos uni o pluricelulares, carentes de clorofila o de cualquier pigmento fotosintético, que se ven forzados a vivir a expensas de otros seres vivos, vegetales o animales, actuando como parásitos, o bien asociándose con ellos en estructuras denominadas micorrizas, o utilizando materiales de desecho de ambos grupos, comportándose entonces como saprófitos.

Sistemáticamente, Whittaker en 1969 elevó a los organismos fúngicos a la categoría de reino, separándolos del reino *Plantae*.

Se habla indistintamente de hongos y setas, sin embargo el término hongo implica un individuo completo con autonomía propia, mientras que las setas sólo son una parte del hongo, es decir, el fruto del mismo u órgano de fructificación, que solo producen los hongos más evolucionados o superiores. (De Diego Calonge, 2011).

1.2. Características macroscópicas de los hongos

Las tres partes más importantes en que se puede clasificar una seta son: sombrero, pie e himenio (García y Sánchez, 2009).

Sombrero: la forma más conocida es la semejante a un paraguas con pie y sombrero, aunque puede presentar numerosas variaciones según el tipo de himenio. Igualmente puede presentar una amplia gama de formas y colores: redondo, plano, cóncavo, convexo, embudado, hemisférico, acampanado, etc.

La cutícula es la membrana exterior que recubre el sombrero. Su estructura y color son muy variables: viscosa o seca, lisa o escamosa, cuarteada o agrietada, fibrosa, verrugosa etc.

Himenio: es la parte fértil del carpóforo, o parte aérea de la seta, donde se localizan las esporas. Las láminas son unos tabiques verticales delgados que se encuentran situados en la parte inferior del sombrero. Van desde el borde del sombrero hasta el pie. Pueden ser separadas, libres, escotadas cuando tienen un entrante en la proximidad del pie, adnatas o adheridas cuando tocan el pie en una pequeña parte o decurrentes si recubren una parte del pie.



Figura I1. Detalle láminas *Marasmius oreades*. Imagen extraída de http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Marasmius_oreades.htm

Pie: es la parte de la seta que sostiene al sombrero. El color, el tamaño, la estructura fibrosa o granulosa o si es hueco o macizo, son caracteres indispensables para la taxonomía. El pie puede ser central, lateral o excéntrico, delgado o grueso, curvado, sinuoso, radicante, atenuado, claviforme, bulboso, fibroso, cartilaginoso o granuloso.

En el pie puede aparecer una estructura denominada anillo cuya aparición se debe a la rotura total o parcial del velo himenal al crecer la seta y extenderse el sombrero, quedando parte de esta membrana roseando el pie.

La carne tiene cuatro características principales, la consistencia, (que puede ser fibrosa granulosa, dura o blanda, compacta o esponjosa, viscosa, coriácea, hígrófana, etc), su color (varía dependiendo de la oxidación y el

clima), su olor (a anís, a ajo, a harina fresca, a fenol, a almendras amargas, a cloro, a patatas crudas, etc) y su sabor (dulce, amargo, picante, agradable, desagradable, etc).

1.3. Características microscópicas de los hongos

Para la correcta determinación de los hongos es imprescindible la observación de los caracteres microscópicos (García y Sánchez, 2009).

Las hifas son las unidades estructurales de la mayoría de los hongos, sobre todo de los filamentosos. Cuando presentan tabiques transversales en forma y número regular, con un poro de comunicación en el centro, se denominan hifas septadas; en los casos en los que carecen de ese tabique se conocen como hifas aseptadas. El conjunto de hifas recibe el nombre de micelio.

Las esporas son los órganos de origen sexual. Es importante el color de la esporada o conjunto de esporas que deja caer el carpóforo cuando está maduro, debido a que es significativo a la hora de identificar la especie. Las esporas son muy variables. Hay esporas esféricas, ovales, globosas, poligonales, estrelladas, cilíndricas, helicoidales, etc. En lo que se refiere a su superficie pueden ser lisas, rugosas, reticuladas, verrugosas, espinosas y pueden presentar tabiques tanto longitudinales como transversales. El tamaño suele variar entre 3 y 20 micras.

Los cuatro tipos de esporas, oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas, definen los cuatro grupos principales de hongos. Las oosporas se forman por la unicon de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas se disponen en grupos de 8 unidades dentro de unas bolsas llamadas ascas (hongos *Ascomycetes*). Las basidiosporas por su parte se

reúnen en conjuntos de cuatro unidades en unas estructuras con forma de maza llamados basidios (hongos *Basidiomycetes*).

1.4. Propiedades nutricionales y medicinales de las setas

Las setas contienen una cantidad muy elevada de agua (entre el 82-92%). En cuanto a las proteínas, su porcentaje en peso seco puede variar entre el 10 y el 30%. En cambio contienen escasos hidratos de carbono y poca grasa, entre un 1-3% de carbohidratos y un 1.5% de grasas, por lo que se han incluido en muchas dietas de adelgazamiento por su bajo contenido calórico.

Nos aportan una cantidad apreciable de sales minerales entre las que abundan el potasio y fósforo. También son ricas en manganeso, zinc, hierro, cloro, boro y azufre, escaseando el sodio. Hay que evitar recolectarlas cerca de las carreteras y fábricas porque tienden a absorber los metales pesados.

Abundan las vitaminas A (destaca el contenido en champiñón), la D por su contenido en ergosterol y la K, vitaminas del grupo B como la riboflavina B2, niacina B3, biotina B8, y ácido fólico, y la vitamina C. En la literatura encontramos un artículo (Gucia et al., 2012) que trata de la riqueza de minerales de *Macrolepiota procera*, una de las setas que se estudiaron en este trabajo.

En cuanto a las propiedades medicinales de los hongos (Chang & Wasser, 2012) encontramos las que actúan como adaptógenos y estimulantes del sistema inmunitario, afrodisíacos, alucinógenos, antibióticos, anticancerígenos, antiosteoporóticos, antivirales, estimulantes del crecimiento de las células nerviosas, inhibidores de la enfermedad de Alzheimer y otras dolencias como Parkinson y Hodgkin, inmunodepresores

etc. (De Diego Calonge, 2011). Estas propiedades asociadas a los hongos se están convirtiendo en recursos importantes de la medicina moderna (Reis y cols., 2011).

1.5. Importancia económica y biológica de las setas

El recurso fúngico ligado a los montes está adquiriendo una importancia creciente desde el punto de vista económico y social. Solamente en especies apreciadas como las del grupo de *Boletus edulis* se comercializan anualmente hasta 20.000 t. A nivel mundial, el volumen de importaciones ligado a los hongos silvestres se cifró en 2002 en más de 600 millones de dólares según la FAO.

La gran riqueza micológica de Castilla y León se manifiesta con más de 1500 especies diferentes, de las cuales 56 presentan una gran calidad gastronómica, 26 se comercializan en menor o mayor grado en España y 8 están consideradas de alto interés comercial. Para esta comunidad se ha estimado una producción comercializada de 2160 t de *Boletus aureus*.

En las últimas décadas se ha afianzado la percepción de los montes como sistemas biológicos multifuncionales. El níscalo (*Lactarius deliciosus*), una de las setas que incluimos en este trabajo, abunda en los pinares jóvenes comercializándose en España unas 35.000t. La plantación de pinos inoculados con hongos apreciados puede llegar a mejorar las producciones micológicas en los terrenos pobres e improductivos, promoviendo la producción en terrenos agrícolas marginales y pedregosos. Boletín Micológico de FAMCAL (Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León). Boletín N°1º, Año 2006.

1.6. Descripción y clasificación científica de los hongos sometidos a estudio

a) *Lactarius deliciosus* L.

- Nombre común: Níscalo, nicalo, esnegorri, rovellon, pinatell.
- Taxonómicamente pertenece a la Clase Homobasidiomycetes, Orden Russulales, Familia Russulaceae.
- Fisiología: el sombrero tiene de 5 a 15 cm, de color anaranjado con círculos concéntricos de tonos rojizos y pálidos. Borde enrollado cuando es joven, se va aplanando con el tiempo hasta llegar a levantarse en la vejez. Láminas anaranjadas que adquieren un tono verde en las zonas manoseadas debido a la oxidación. Segrega un líquido de color anaranjado-zanahoria cuando se corta cualquier parte de la seta. El pie tiene una longitud similar al diámetro del sombrero si la seta es joven. Es del color del sombrero pero más pálido, con algunos hoyitos superficiales. Suelen tener parásitos siendo comunes ciertos hongos de Hypomyces o Peckiella.
- Ecología: crece siempre donde hay coníferas, especialmente del género Pinus, con las que forma micorrizas (simbiosis entre un hongo y las raíces de la planta) y abunda en otoño e incluso en meses templados cuando llueve lo suficiente.



Figura I2.Ejemplares de *L.deliciosus*. Imagen extraída de <http://www.cestaysetas.com/informacion-micologica/guia-de-setas/lactarius-deliciosus/>

- Es la seta silvestre más consumida en España. El francés Georges Becker dice que el apelativo “deliciosus” se lo dio Linneo al equivocarse con *Lactarius sanguifluus* que es verdaderamente delicioso.

La seta *Lactarius deliciosus* desde el punto de vista medicinal, presenta un compuesto llamado “lactarioviolina” con propiedades antibióticas. Además puede utilizarse como indicador de la actividad renal.

b) *Marasmius oreades* (Bolton)

- Sinónimo: *Marasmius caryophylleus*. Nombre común: senderuela, carrerilla.
- Taxonomía: Clase Homobasidiomycetes, Orden Tricholomatales y Familia Marasmiaceae.
- Fisiología: sombrero de 2 a 7cm, al principio acampanado, después convexo y finalmente extendido. Es higrófana y según el grado de hidratación el color varía desde un color crema cuando la seta está hidratada hasta un tono blanquecino en estado seco. El pie central es de color blanquecino y consistencia elástica.



Figura I3. Ejemplares de *M.oreades*. Imagen extraída de <http://www.mycovaud.ch/gallery/smv2001/aao>

- Ecología: crecen en primavera y otoño aunque es posible encontrarlas todo el año en climas templados. Crecen varios ejemplares formando un círculo al que se suele llamar corro de brujas.
- Esta especie puede confundirse con *Marasmius collinus* cuya carne desprende un olor desagradable y con setas tóxicas con las que comparte hábitat de los géneros *Inocybe*, *Citocybe* y *Lepiota*.
- Culinariamente esta seta tiene un sabor fino y delicado siempre y cuando desechemos el pie aunque hay quien los deja secar y los tritura para utilizarlos como condimento.

La razón por la cual la seta tiene sabor dulce se debe a la presencia de trehalosa, un disacárido de glucosa con bajo poder edulcorante. La ausencia de la enzima trehalasa provoca la intolerancia a la trehalosa o intolerancia a los champiñones que es muy difícil de diagnosticar. Este azúcar permite que la seta reviva al contacto con el agua además de posibilitar la reproducción celular y la creación de esporas.

Por último, *Marasmius oreades* presenta un compuesto con propiedades antibióticas como es el “ácido marásmico” que inhibe el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

c) ***Macrolepiota procera* (SCOP.) SINGER**

- Nombre sinónimo: *Lepiota procera* Gray, Nombre común: galamperna, apagador, matacandelas.
- Taxonomía: Clase Homobasidiomycetes, Orden Agaricales y Familia Agarciaceae.



Figura I4. Ejemplar de *Macrolepiota procera*. Imagen extraída de <http://unpaseomanchego.blogspot.com.es/2009/11/la-macrolepiota-procera-una-gran-seta.html>

- Sombrero de gran tamaño que puede llegar a 30 cm de diámetro en su madurez. Láminas libres de color blanco cremoso, sus aristas oscurecen levemente con la edad. El pie es cilíndrico, grueso, recto, hueco y largo. Carne tierna y blanca en el sombrero, dura y leñosa en el pie.
- Ecología: especie abundante y extendida, fructifica en casi todos los hábitats. Todas las *Lepiotas* venenosas son de talla pequeña (4-5 cm.).

1.7. Efecto antioxidante y radicales libres

Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados y que es capaz de mantener una existencia independiente. Los radicales libres más frecuentes son los derivados del oxígeno y colectivamente se denominan ROS (especies reactivas de

oxígeno). Dentro de los radicales libres del oxígeno, los más importantes son el oxígeno singulete (O_2), el radical subperóxido (H_2O_2), el radical nitrosilo ($ONOO^-$) y el ozono (O_3). Existen también radicales libres de otros átomos, en particular los del azufre.

Los radicales libres se generan siempre que exista actividad vital, como consecuencia de las reacciones metabólicas en las cuales se oxidan sustratos, en particular en el proceso de fosforilación oxidativa. Por tanto aunque se asocian al estrés oxidativo y el envejecimiento, es necesario cierto nivel de ROS para los procesos celulares y la eliminación de demasiadas especies reactivas de oxígeno puede tener consecuencias perjudiciales para el organismo.

Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación. El antioxidante al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Los antioxidantes dietarios son muy variados (Diplock y cols., 1998), pero se podría asegurar que entre los más importantes podemos incluir la vitamina C o ácido ascórbico, los tocoferoles, los carotenos y sus derivados y las sustancias fenólicas, fundamentalmente los polifenoles (Robaszkiewicz y cols. 2010).

1.8. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos naturales que poseen uno o más grupos fenol, un anillo aromático con al menos un grupo funcional. Muchos son metabolitos secundarios de las plantas (Apak y cols. 2007).

Según su estructura química podemos clasificarlos en fenoles simples y fenoles complejos. Los fenoles simples a su vez podemos subdividirlos en tres grupos: a) fenilpropanoides simples los que tienen un

esqueleto básico de fenilpropanoides (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Aquí encontramos el ácido p-cumárico, el ácido trans-cinámico y sus derivados como el ácido cafeico, conocido por su capacidad antitumoral; b) lactonas fenilpropanoides (cumarinas). Fuente de anticoagulantes naturales (ej. Dicumarol) y c) derivados del ácido benzoico. La estructura es un anillo aromático unido a un carbono. Son formados a partir de fenilpropanoides. Estos compuestos se encuentran en la mayoría de frutas (especialmente en las bayas), setas, canela, clavo y productos lácteos fermentados. Entre los compuestos derivados destacan la vainillina y el ácido salicílico.

En cuanto a los fenoles complejos, los dividimos en: a) lignanos que son metabolitos secundarios de plantas que se encuentran en semillas de lino, calabaza, ajonjolí, centeno, soya, brócoli y en algunas bayas; b) flavonoides: se sintetizan en todas las plantas terrestres. Encontramos en este grupo a flavanoles, flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas y antocianidinas.

Los compuestos fenólicos se encuentran entre las sustancias bioactivas más potentes y útiles terapéuticamente proporcionando beneficios para la salud asociados con un menor riesgo de enfermedades crónicas y degenerativas. Muchos de estos efectos se atribuyen a la actividad antioxidante y el bloqueo de radicales libres. (Barros y cols. 2009).

Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden ayudar por acción directa sobre las especies reactivas del oxígeno ROS o por la estimulación endógena de los sistemas de defensa. Los grupos fenol de los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar un radical fenoxil relativamente estable, alterando así la cadena de reacciones oxidativas. (Scalbert y cols. 2005).

Las propiedades antioxidantes están correlacionadas con diferentes componentes antioxidantes como los tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico y fenoles totales; sin embargo poco se sabe sobre los componentes fenólicos individuales presentes en las especies de setas. (Barros y cols. 2009) y su comportamiento a diferente tiempo y temperatura (Wang y Zheng. 2001).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

- a) Medida de los fenoles totales, la capacidad antioxidante y antirradicalaria de las setas comestibles *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*.
- b) Estudio de la degradación a diferentes temperaturas y tiempos de los fenoles totales y pérdida de la capacidad antioxidante y antirradicalaria de *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material de laboratorio

3.1.1. Equipos

Equipo	Casa Comercial
Agitador de tubos.	Raypa.
Agitador magnético ACS-160.	J.Jimeno S.A.
Balanza de precisión.	KERN ABS.
Balanza.	KERN 572.
Batidora.	Moulinex.
Baño de agua.	Velp Scientifica (multistirrer 6).
Centrifuga.	Digiten-R ORTO ALRESA.
Congelador -24°C.	Fagor.
Equipo de agua.	Elix. Millipore.
Espectrofotómetro.	HELIOS α Thermo.
Equipo pHmetro.	pH-meter basic 20 + CRISON.
Pipetas automáticas.	Proline Plus de Biohit.

3.1.2. Material fungible

Botellas de vidrio.

Cubetas de espectrofotometría.

Espátulas.

Erlenmeyers de vidrio.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Matraces erlenmeyers.

Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.

Papel de filtro convencional (Afora).

Pinzas y tijeras de acero inoxidable.

Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.

Probetas de vidrio.

Puntas de pipeta automática.

Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

Vasos de precipitados de vidrio.

1.1.3. Reactivos

Reactivo	Casa Comercial
Cloruro de cobre (II).	Aldrich.
Acetato de amonio.	Sigma.
Ácido gálico.	Sigma.
Neocuproína.	Sigma.
Etanol.	Merck.
Trolox.	Aldrich.
Metanol.	Panreac.
DPPH.	Aldrich.
Carbonato de sodio.	Sigma.
Reactivo de Folin-Ciocalteau.	Fluka

1.1.4. Material biológico

El material biológico empleado para la obtención de los extractos que se han utilizado para la realización del trabajo de investigación fueron los tres hongos de estudio recogidos e identificados por D. Santiago de Castro Alfageme (Junta de Castilla y León) en:

- *Marasmius oreades*: recogida en Aldeamayor de San Martín (Valladolid) en Noviembre de 2012.

- *Lactarius deliciosus*: recogida en Trabazos (Zamora) en Noviembre de 2012.
- *Macrolepiota procera*: recogida en Suárbol (León) en Octubre de 2012.

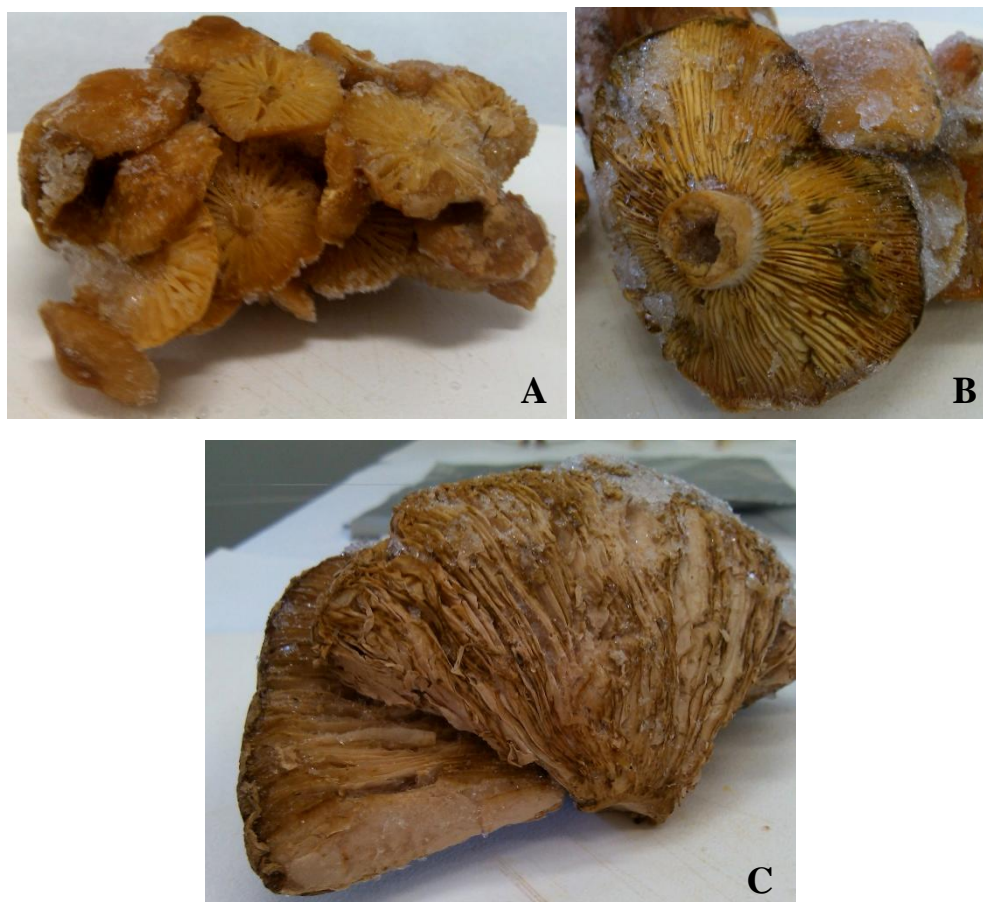


Figura M1. Muestras de *Marasmius oreades* (A), *Lactarius deliciosus* (B) y *Macrolepiota procera* (C).

3.2. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos se partió de muestras de *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*. Se descongelaron las setas, se cortaron en trozos pequeños diferenciando dos partes pie y sombrero, posteriormente se trituraron en una batidora con 50 ml de agua para cada parte (5g de sombrero en 50 ml y 5 g de pie en 50 ml), guardando siempre la cadena de frío (0°C).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se pasaron las muestras a un vaso de precipitados de 100 ml con los 50 ml de extracto en agitación constante y a una temperatura de 4° C durante 30 minutos en cámara fría. El extracto se filtró con una doble gasa de nylon y el filtrado obtenido se sometió a una primera centrifugación de 45 min a 3.500 r.p.m (equilibrar los tubos) en centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142 en tubos de 50 ml cada uno a una temperatura de trabajo de 4° C. Se recuperó el sobrenadante, desechando el pellet (Figura A) y se sometió a una segunda centrifugación de 30 min a 3.500 r.p.m y 4° C de temperatura.

El sobrenadante se recogió y filtró a través de un filtro de papel de doble capa con pliegues (Anoia de 73 g/m²). Se apuntaron los volúmenes recogidos. El volumen recuperado en este proceso es la base para la posterior purificación o análisis y se denomina extracto crudo (Figura B). Se midieron medimos los volúmenes recogidos de los diferentes extractos crudos y se pasó a su posterior análisis.

Los extractos así obtenidos se repartieron en alícuotas de 1000 µl en microtubos, se etiquetaron y se colocaron en el congelador a -20° C.

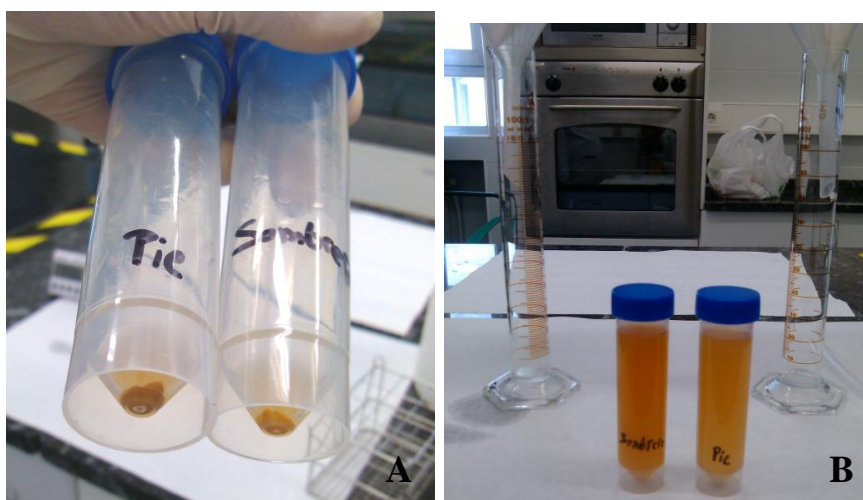


Figura M2. Pellet de la muestra después de la centrifugación (A) y extractos crudos de sombrero y pie de una de las setas (B).

3.3. Determinación de fenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Sin embargo este reactivo no solo mide los fenoles totales sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora, por lo que mide la capacidad reductora total de una muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul, que es el que medimos a una longitud de onda de 760 nm.

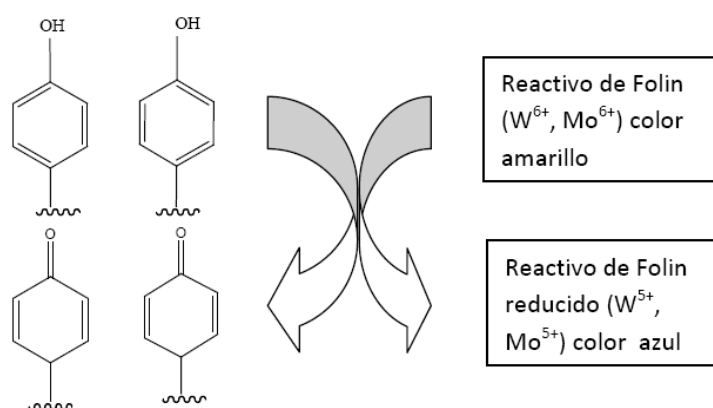


Figura M3. Reacción de Folin-Ciocalteu. Imagen extraída de Girbés y Jiménez. Cuaderno de prácticas de Radicales libres y antioxidantes dietarios (2010).

Para realizar la recta patrón se añadió la cantidad de agua destilada correspondiente, así como la cantidad (20 μ l, 40 μ l, 60 μ l y 80 μ l) de ácido gálico 2,5 mM en agua. Se añadieron a cada tubo 600 μ l de solución de carbonato sódico al 7,5 % y se agitaron los tubos en el “vórtex”.

Posteriormente se añadieron a cada tubo 200 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó nuevamente. Se coloca la gradilla con los tubos en un

baño de agua a 50°C y se incubaron 10 minutos. A continuación se midió la absorbancia de las disoluciones a 760 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de ácido gálico (2,5 mM) y se expresaron en µg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. La medida de los diferentes extractos se realiza sustituyendo en el método, el patrón de ácido gálico, por un volumen de extracto. Para los cálculos debemos tener en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo).

Para los ensayos de degradación las muestras se hirvieron a 90° C y a diferentes tiempos; y también a diferentes temperaturas. Los resultados se expresaron en tanto por ciento (%) de degradación.

3.4. Determinación de la actividad antioxidante por el método de CUPRAC

Este ensayo mide la capacidad antioxidante reductora de los antioxidantes de la muestra. Se utiliza la Neocuproína y se basa en una reducción cúprica de Cu (II) a Cu (I) por la acción como agente oxidante cromogénico. El máximo de absorción está a 450 nm.

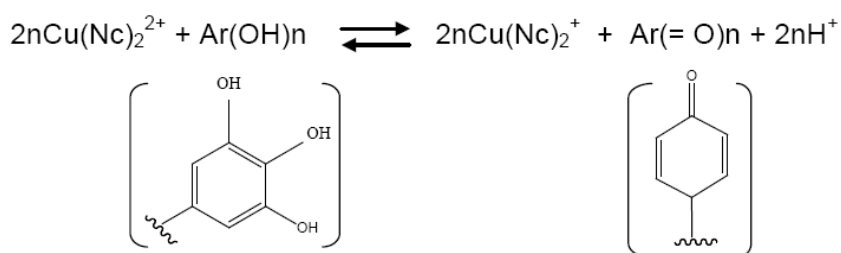


Figura M4. Reacción del método de CUPRAC. Imagen extraída de Girbés T. y Jiménez P. Cuaderno de prácticas de Radicales libres y antioxidantes dietarios (2010).

Para realizar la recta patrón utilizamos 1mM de ácido gálico en etanol como patrón. Se añade a cada tubo 1ml de 10 mM de Cloruro de Cobre (II), y la misma cantidad de 7,5 mM de Neocuproína en etanol.

Posteriormente se añade a cada tubo 1ml de 1mM de acetato de amonio (pH=7), añadimos los diferentes volúmenes del patrón de ácido gálico y la cantidad correspondiente de agua para alcanzar un volumen final de 4 ml. Se espera 1 hora y se mide la absorbancia a 450 nm.

Los resultados se interpolan en la curva de calibrado de 1mM de ácido gálico y se expresan en μg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.

3.5. Determinación de la actividad antirradicalaria con el método del radical DPPH \cdot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

El radical DPPH \cdot tiene un electrón desapareado lo que le otorga una coloración violeta y cuando entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno u otra especie de radical, se reduce a DPPH-H con la consiguiente pérdida de color, y disminución de la absorbancia (Brand-Williams y cols., 1995). Para la recta patrón la solución que dona los electrones, el agente reductor, será el Trolox, que posteriormente sustituiremos por nuestras muestras.

El DPPH \cdot sólo puede disolverse en medio orgánico (en nuestro caso metanol) y la concentración que se utilizó fue 0,1 mM. La cuantificación se realizó empleando una solución patrón de Trolox (1 mM en metanol). Para realizar la recta patrón añadimos la cantidad de metanol al 80 % correspondiente para obtener un volumen final de 3 ml, así como 2.900 μl de DPPH 0,1 mM en metanol. Se añade a cada tubo 25, 50, 75 y 100 μl respectivamente de solución de Trolox 1 mM (patrón) en metanol y se

agitan los tubos. La reacción se mide a los 10 minutos del inicio, ya que en este intervalo, la mayoría de sustancias completan la reacción con el DPPH·. Anotamos la absorbancia a 515 nm.

Representamos la recta patrón de degradación del radical DPPH· con respecto a los volúmenes de Trolox 1 mM añadidos. Para los cálculos tuvimos en cuenta el volumen de extracto utilizado y el volumen de extracto de partida (extracto crudo).

Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de Trolox (1 mM) y se expresaron en µg equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco. Para los ensayos de degradación las muestras se hierven a 90° C y a diferentes tiempos; y también a diferentes temperaturas. Los resultados se expresan en tanto por ciento (%) de degradación.

4. RESULTADOS

4.1. Volúmenes de los extractos crudos de hongos

Estos volúmenes se utilizarán para los cálculos en los diferentes métodos espectrofotométricos: Folin-Ciocalteu, CUPRAC y radical DPPH.

Tabla R1. Volúmenes media de los extractos de sombrero y pie.

Especie	Sombrero	Pie
<i>Marasmius oreades</i>	38 ml	38 ml
<i>Lactarius deliciosus</i>	38 ml	37 ml
<i>Macrolepiota procera</i>	41 ml	27 ml

Las abreviaturas de las setas serán MO (*Marasmius oreades*), LD (*Lactarius deliciosus*) y MP (*Macrolepiota procera*).

4.2. Medida de los fenoles totales por el Método de Folin-Ciocalteu

Realizamos la recta patrón por triplicado, calculamos el valor medio de las diferentes absorbancias y representamos la recta patrón (Figura R1).

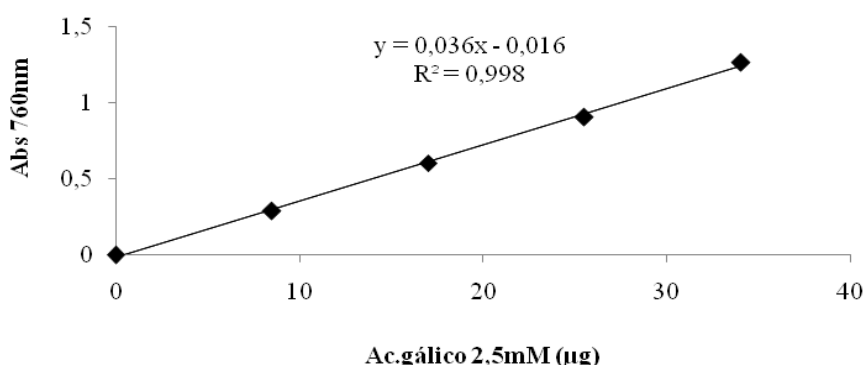


Figura R1. Determinación de fenoles totales. Recta patrón. En el eje de abscisas se expresan los microgramos (μg) de ácido gálico a una concentración de 2.5 mM y en eje de ordenadas, la absorbancia (Abs, de ahora en adelante) a 760 nanómetros (nm).

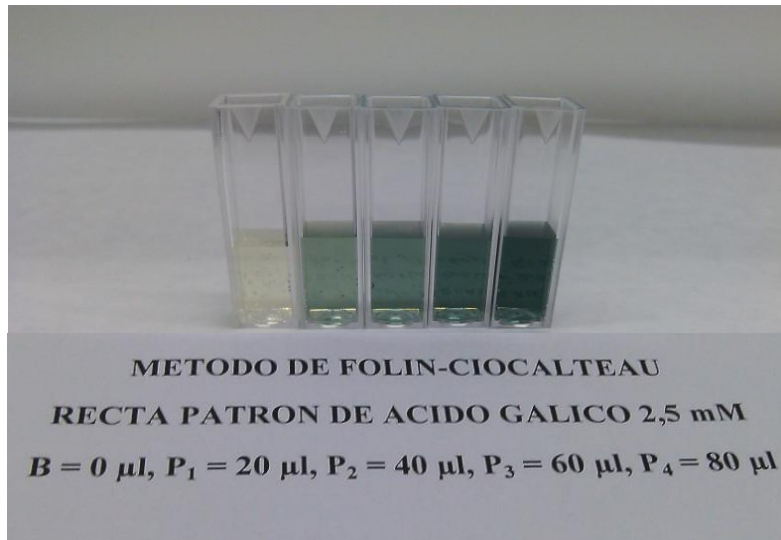


Figura R2. Método de Folin-Ciocalteu. Recta patrón

Para determinar los fenoles totales se utilizó el reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteu. Los fenoles totales de sombrero y pie de las tres setas están recogidos en la Tabla R2 y la Figura R3.

La mayor concentración de fenoles se obtuvo en el sombrero de *Macrolepiota procera*, y después en el sombrero de *Marasmius oreades* con valores de 2200 y 1500 microgramos equivalentes de ácido gálico/gramos de seta, respectivamente.

Tabla R2. Determinación de fenoles totales. Los fenoles totales se expresan como microgramos (μg) equivalentes de ácido gálico/g de peso.

Método de Folin-Ciocalteu	μg equivalentes ácido gálico/g de peso (media \pm desviación estándar)
MO Sombrero	1430 \pm 104
MO Pie	975 \pm 16
LD Sombrero	573 \pm 39
LD Pie	477 \pm 18
MP Sombrero	2159 \pm 146
MP Pie	598 \pm 50

Pensamos que los resultados recogidos en la anterior tabla son más visuales en el diagrama de barras que presentamos a continuación pese a que podría considerarse duplicación de la información. Seguiremos con este sistema durante todo el trabajo.

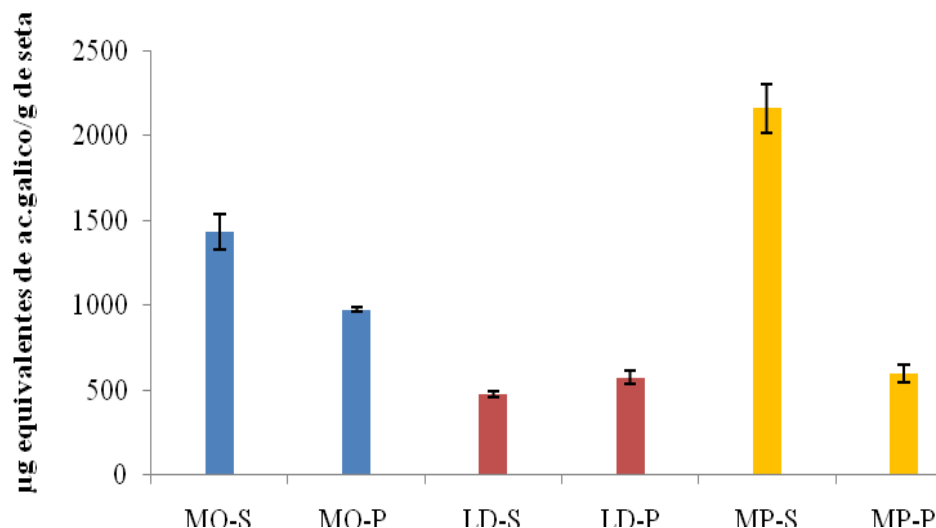


Figura R3. Fenoles totales en las setas *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*. Extractos del sombrero de *Marasmius oreades* (MOS), pie de *Marasmius oreades* (MOP), sombrero de *Lactarius deliciosus* (LDS), pie de *Lactarius deliciosus* (LDP), sombrero de *Macrolepiota procera* (MOS) y pie de *Macrolepiota procera* (MOP). Las barras indican el error expresado como desviación típica o estándar.

4.3. Medida de la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC

Para la medida de la capacidad antioxidante se utilizó el procedimiento de oxidación-reducción de cobre utilizando la Neocuproína, procedimiento denominado CUPRAC. Como patrón se utilizó ácido gálico. La recta de calibración se muestra en la Figura R5.



Figura R4. Método de CUPRAC. Recta patrón.

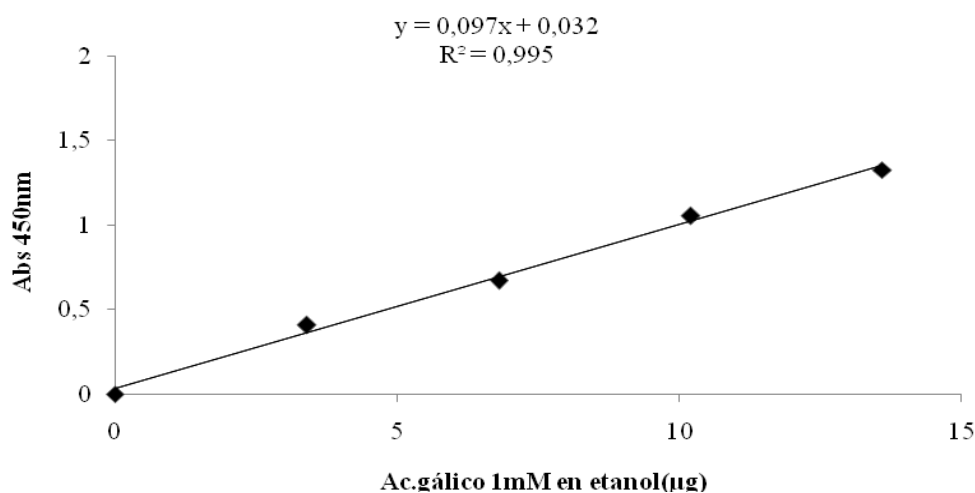


Figura R5. Determinación de la capacidad antioxidante según el método de CUPRAC. Recta patrón.

A continuación se determinó la capacidad antioxidante de sombrero y pie de las tres setas objeto de estudio, *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera* como se indica en la Tabla R3 y Figura R6. Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante se corresponden bastante bien con los resultados obtenidos en los fenoles totales, lo que sugiere que dicha actividad se debe fundamentalmente a las sustancias fenólicas en las muestras de setas.

Tabla R3. Capacidad antioxidante según el método de CUPRAC. La capacidad antioxidante se expresa en microgramos (μg) equivalentes de ácido gálico/g de peso.

Método de CUPRAC	μg equivalentes ácido gálico/g de peso
MO Sombrero	425 ± 3
MO Pie	257 ± 31
LD Sombrero	92 ± 2
LD Pie	63 ± 3
MP Sombrero	587 ± 89
MP Pie	138 ± 5

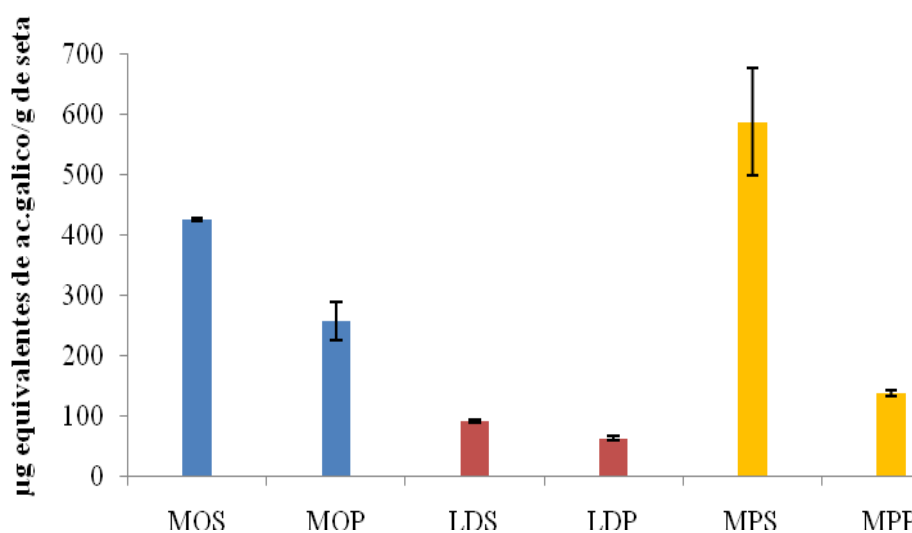


Figura R6. Capacidad antioxidante de las setas *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*. Extractos del sombrero de *Marasmius oreades* (MOS), pie de *Marasmius oreades* (MOP), sombrero de *Lactarius deliciosus* (LDS), pie de *Lactarius deliciosus* (LDP), sombrero de *Macrolepiota procera* (MOS) y pie de *Macrolepiota procera* (MOP).

4.4. Medida de la capacidad antirradicalaria. Método del radical DPPH

La capacidad antirradicalaria se determinó siguiendo la decoloración del radical libre estable DPPH· dependiente de la presencia de sustancias con capacidad antirradicalaria. En la figura R7 se puede observar el efecto del Trolox, análogo de la vitamina E sobre el proceso de decoloración del radical libre.

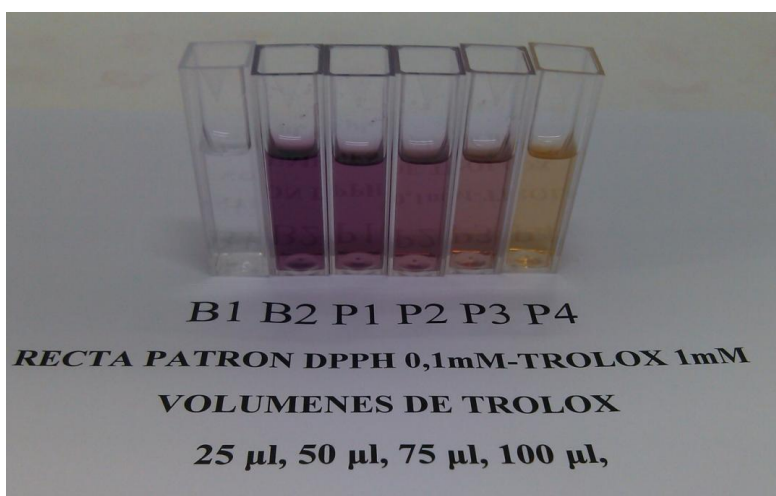


Figura R7. Método de DPPH·; Recta patrón.

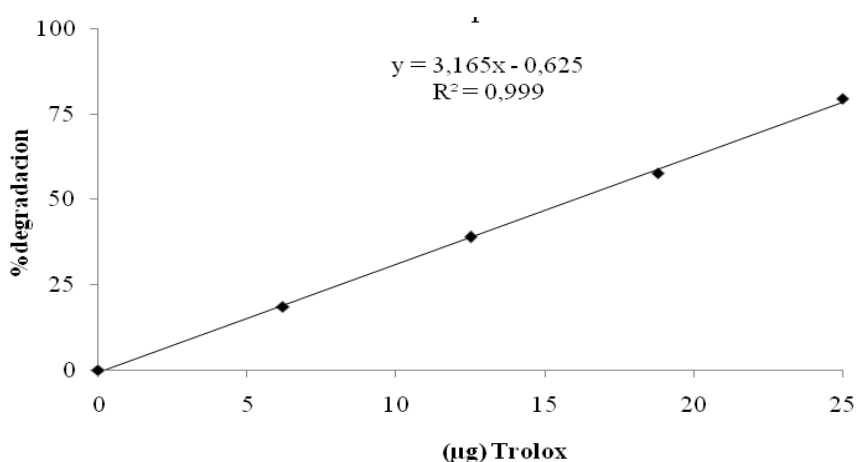


Figura R8. Determinación de la capacidad antirradicalaria según el método del radical DPPH·-Trolox. Recta patrón.

4. RESULTADOS

En la Tabla R4 se presentan los resultados obtenidos con las setas objeto de estudio. Como se puede comprobar mientras que *Macrolepiota procera* presenta una fuerte actividad antirradicalaria (1668 microgramos equivalentes de Trolox/ g de seta) en el sombrero, presenta una actividad muy pequeña en el pie (100 microgramos equivalentes de Trolox/ g de seta), *Marasmius oreades* presenta una buena actividad antirradicalaria tanto en sombrero como pie. En contraste *Lactarius deliciosus* no presenta actividad antirradicalaria significativa, lo que sugiere que la actividad antioxidante es distinta que la antirradicalaria.

Tabla R4. Determinación de la capacidad antirradicalaria según el método del radical DPPH·-Trolox. La capacidad antioxidante se expresa en microgramos (μg) equivalentes de Trolox/g de peso.

Método de DPPH·	μg equivalentes Trolox/g de peso
MO Sombrero	471 \pm 182
MO Pie	785 \pm 4
LD Sombrero	14 \pm 6
LD Pie	18 \pm 1
MP Sombrero	1668 \pm 58
MP Pie	141 \pm 30

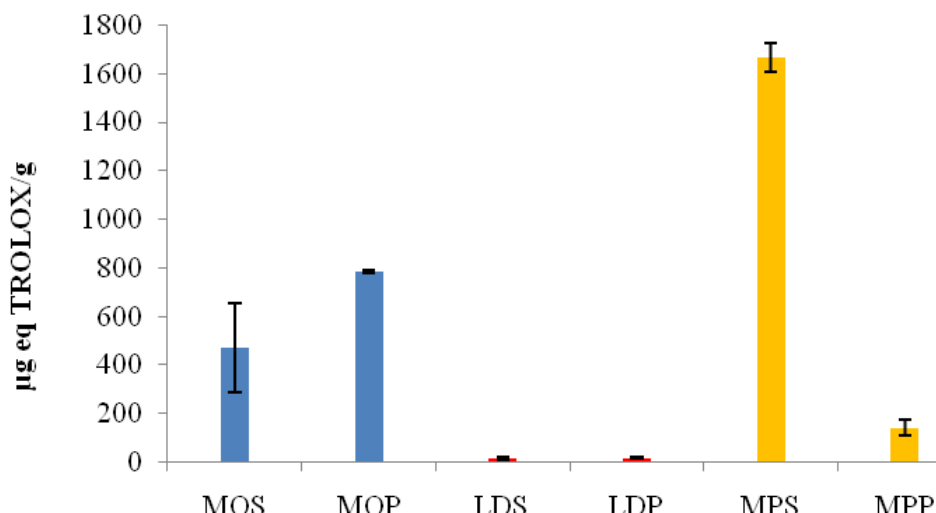


Figura R9. Determinación de la capacidad antirradicalaria según el método del radical DPPH·-Trolox de las setas *Marasmius oreades*, *Lactarius deliciosus* y *Macrolepiota procera*. En el eje de ordenadas encontramos los microgramos equivalentes de Trolox/ gramos de seta.

4.5. Estudio de los efectos de la incubación a distintas temperaturas y tiempos sobre los fenoles totales, capacidad antioxidante y antirradicalaria en la seta *Marasmius oreades*

4.5.1. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los compuestos fenólicos

Los extractos crudos de la seta se sometieron a incubación en baños de agua hirviendo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos).



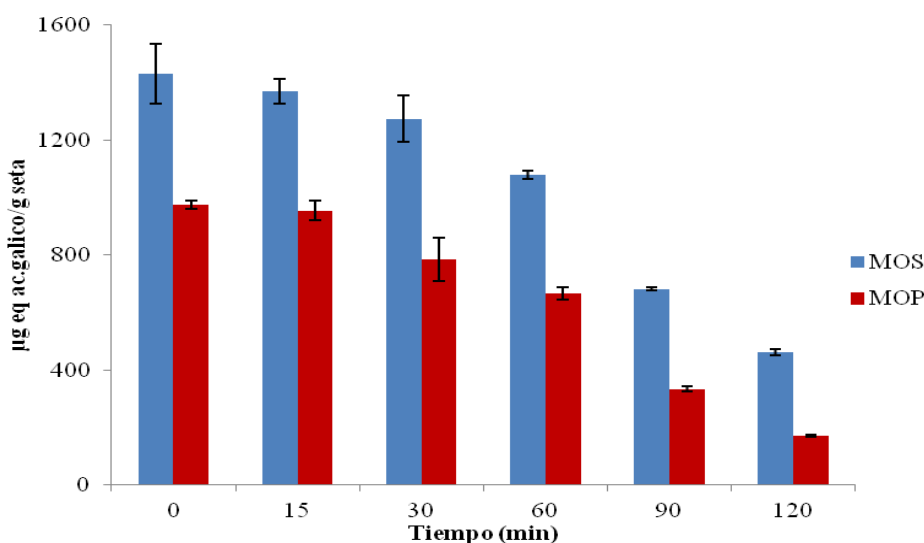
4. RESULTADOS

Figura R10. Determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Muestras de las tres setas en las que medimos su degradación a T°90 durante 30'.

Como puede observarse en la Tabla R5 y Figura R11, aunque no existe un patrón definido podríamos decir que la mayor degradación se produce a los 60' de incubación a 90°C.

Tabla R5. Fenoles totales en la seta *Marasmius oreades* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°C expresada en microgramos (µg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Fenoles totales: µg equivalentes ácido gálico/g de peso (% degradación)		
Tiempo (min)	MO Sombrero	MO Pie
0	1430 ± 104 (100 ± 0)	975 ± 16 (100 ± 0)
15	1370 ± 42 (96 ± 3)	955 ± 35 (98 ± 4)
30	1274 ± 80 (89 ± 3)	785 ± 77 (80 ± 2)
60	1080 ± 15 (76 ± 1)	668 ± 22 (68 ± 2)
90	68 ± 7 (48 ± 1)	333 ± 9 (34 ± 1)
120	463 ± 10 (32 ± 1)	172 ± 3 (18 ± 1)



4. RESULTADOS

Figura R11. Fenoles totales en la seta *Marasmius oreades* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°C expresada en microgramos (µg) equivalentes (eq.) de ácido gálico/g seta.

Tabla R6. Capacidad antioxidante en la seta *Marasmius oreades* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°C expresada en microgramos (µg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Capacidad antioxidante: µg equivalentes ácido gálico/g de peso (% degradación)		
Tiempo (min)	MO Sombrero	MO Pie
0	425 ± 3 (100 ± 0)	256 ± 31 (100 ± 0)
15	312 ± 14 (73 ± 3)	203 ± 1 (79 ± 1)
30	254 ± 16 (60 ± 4)	162 ± 7 (63 ± 3)
60	220 ± 5 (52 ± 1)	139 ± 2 (54 ± 1)
90	115 ± 1 (27 ± 1)	53 ± 5 (21 ± 3)
120	67 ± 1 (16 ± 1)	19 ± 2 (7 ± 1)

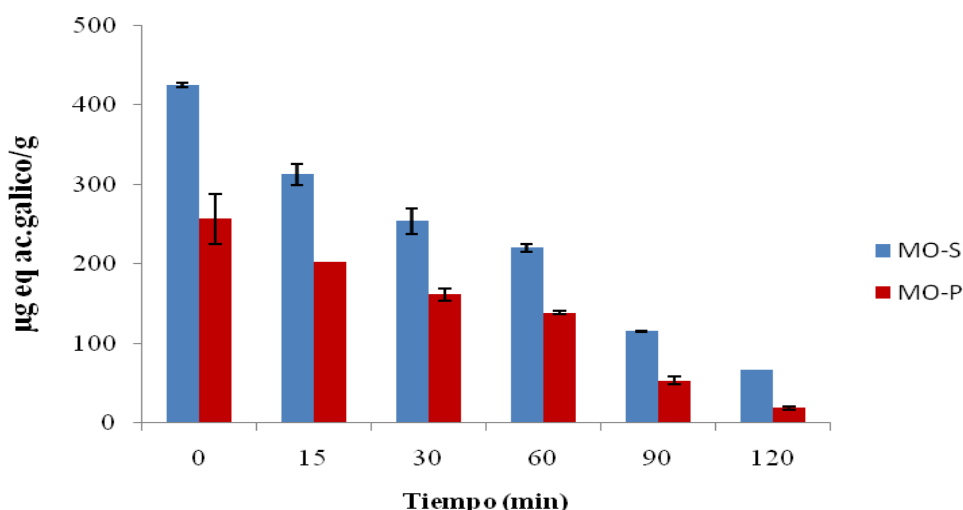


Figura R13. Capacidad antioxidante de la seta *Marasmius oreades* según el método de CUPRAC después de someterse a la degradación a 90°C a diferentes tiempos.

4. RESULTADOS



Figura R14. Método de CUPRAC. Muestras de las tres setas en las que medimos su degradación a T^o90 durante 30'.

Para el Método de DPPH· representamos juntas las dos setas que tienen valores más significativos, sombrero y pie de *Marasmius oreades* y el sombrero de *Macrolepiota procera* en la Tabla R7 y la Figura R15.

La pérdida más importante de capacidad antirradicalaria en *Marasmius oreades* se produce entre 30 y 60 minutos, mientras que en el caso del sombrero de *Macrolepiota procera* es en los primeros 30 minutos.

Tabla R7. Determinación de la capacidad antirradicalaria de *Marasmius oreades* (sombrero y pie) y de *Macrolepiota procera* (sombrero) según el método de DPPH·. Valores de la degradación a 90°C expresados como microgramos (μg) equivalentes Trolox/g de peso. En paréntesis tenemos los la degradación expresada en %.

Capacidad antirradicalaria: (% degradación)			
Tiempo (min)	MO Sombrero	MO Pie	MP Sombrero
0	471 ± 182	785 ± 4	1668 ± 58
15	424 ± 18 (100 ± 0)	474 ± 13 (100 ± 0)	1500 ± 22 (100 ± 0)
30	375 ± 22 (72 ± 4)	277 ± 6 (59 ± 1)	761 ± 12 (51 ± 1)
60	224 ± 14 (43 ± 3)	222 ± 9 (47 ± 2)	555 ± 23 (37 ± 2)
90	169 ± 10 (32 ± 2)	151 ± 15 (32 ± 3)	409 ± 18 (27 ± 1)
120	150 ± 9 (29 ± 2)	121 ± 7 (25 ± 2)	285 ± 28 (19 ± 2)

4. RESULTADOS

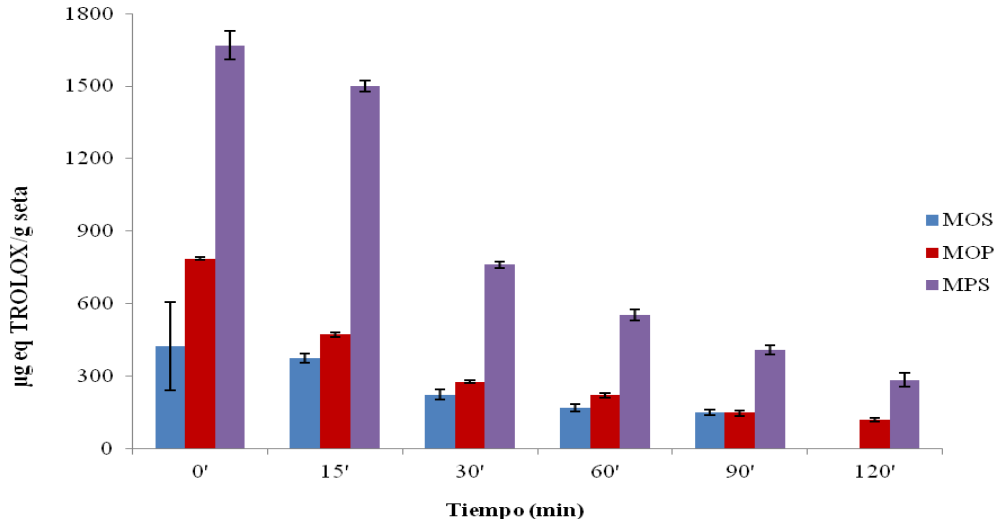


Figura R15. Capacidad antirradicalaria de la setas *Marasmius oreades* y *Macrolepiota procera* según el método de DPPH· tras su degradación a 90°C.

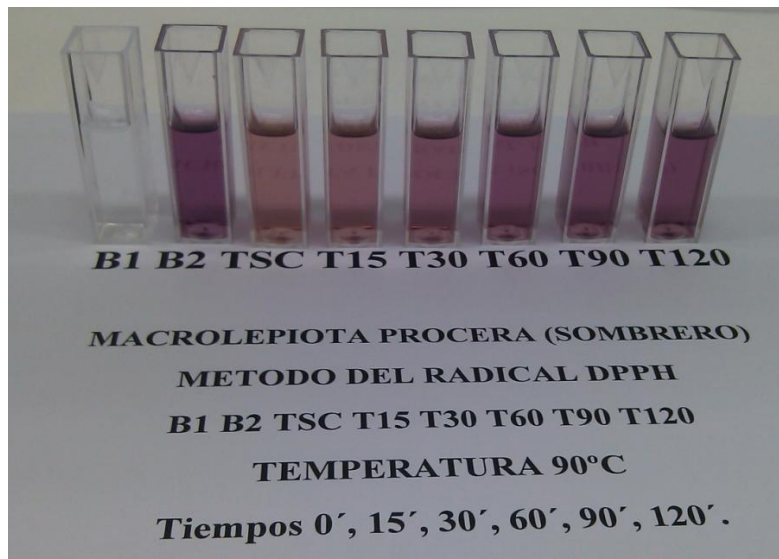


Figura R16. Método de DPPH· para la muestra del sombrero de *Macrolepiota procera* (MPS) a distintos tiempos con T⁹⁰°C.

4.5.2. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos a diferentes temperaturas durante un tiempo de 30 minutos.

Tabla R8. Fenoles totales según el método de Folin-Ciocalteu para la seta *Marasmius oreades* tras su degradación durante 30' a diferentes temperaturas. Los fenoles totales se expresan en μg equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis encontramos los fenoles totales expresados en % degradación.

Fenoles totales: tiempo 30'		
μg equivalentes ácido gálico/g de peso		
(% degradación)		
T^a ($^{\circ}\text{C}$)	MO Sombrero	MO Pie
20	1631 ± 155 (100 ± 0)	2086 ± 68 (100 ± 0)
50	1551 ± 148 (95 ± 9)	1525 ± 42 (73 ± 2)
70	1267 ± 114 (78 ± 7)	1404 ± 29 (67 ± 1)
90	987 ± 27 (61 ± 2)	1232 ± 40 (59 ± 2)

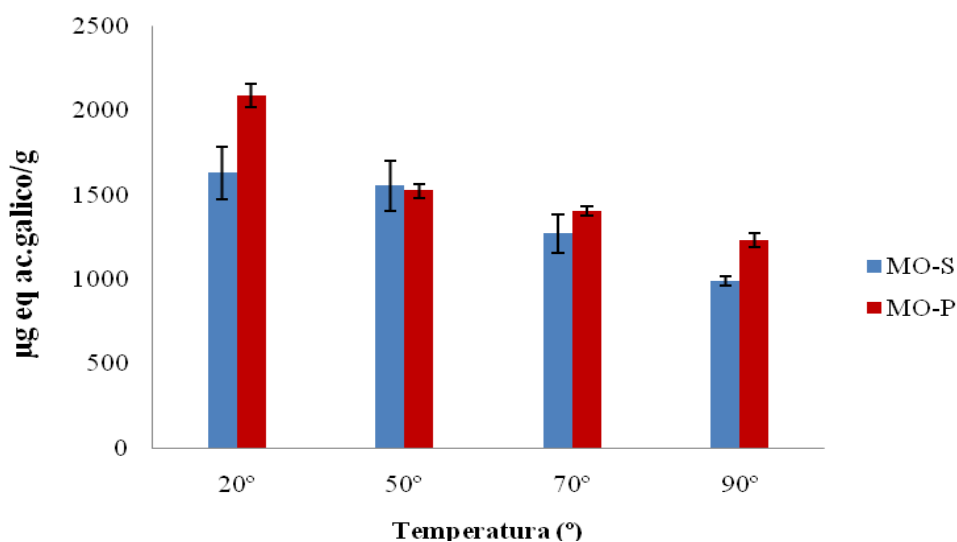


Figura R17. Fenoles totales según el método de Folin-Ciocalteu para la seta *Marasmius oreades* tras su degradación durante 30'. En el eje de ordenadas encontramos los microgramos equivalentes de ácido gálico/g de seta

4. RESULTADOS

Tabla R9. Capacidad antioxidante de *Marasmius oreades* mediante el método de CUPRAC tras la degradación a 30'. La capacidad antioxidante se expresa como μg equivalentes ácido gálico/g de peso. Entre paréntesis encontramos la capacidad antioxidante expresada en % de degradación.

Capacidad antioxidante: tiempo 30'		
μg equivalentes ácido gálico/g de peso		
T ^a (°C)	MO Sombrero	MO Pie
20	434 ± 9 (100 ± 0)	434 ± 11 (100 ± 0)
50	357 ± 9 (82 ± 2)	357 ± 9 (82 ± 2)
70	309 ± 4 (71 ± 1)	301 ± 17 (69 ± 4)
90	254 ± 21 (58 ± 5)	247 ± 31 (57 ± 7)

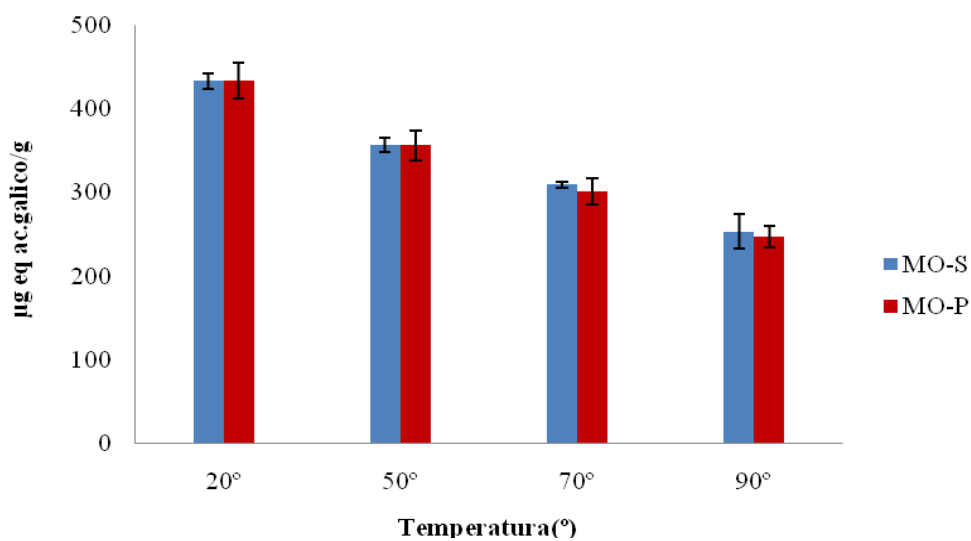


Figura R18. Capacidad antioxidante de *Marasmius oreades* mediante el método de CUPRAC tras la degradación durante 30'. En el eje de ordenadas encontramos los microgramos equivalentes de ácido gálico/g de seta.

4. RESULTADOS

Tabla R10. Capacidad antirradicalaria de las setas *Marasmius oreades* (sombbrero y pie) y *Macrolepiota procera* (sombbrero) según el método de DPPH tras una degradación durante 30' a diferentes temperaturas. La capacidad antirradicalaria se expresa en microgramos (μg) equivalentes Trolox/g de peso. Entre paréntesis expresamos la capacidad antirradicalaria en % de degradación.

Capacidad antirradicalaria: tiempo 30'			
μg equivalentes Trolox/g de peso			
T ^a (°C)	MO Sombbrero	MO Pie	MP Sombbrero
20	471 \pm 182 (100 \pm 0)	785 \pm 4 (100 \pm 0)	1668 \pm 58 (100 \pm 0)
50	448 \pm 12 (98 \pm 2)	620 \pm 21 (79 \pm 2)	1173 \pm 137 (70 \pm 8)
70	422 \pm 20 (90 \pm 4)	532 \pm 17 (68 \pm 2)	974 \pm 22 (58 \pm 1)
90	375 \pm 22 (72 \pm 4)	277 \pm 6 (59 \pm 1)	761 \pm 12 (51 \pm 1)

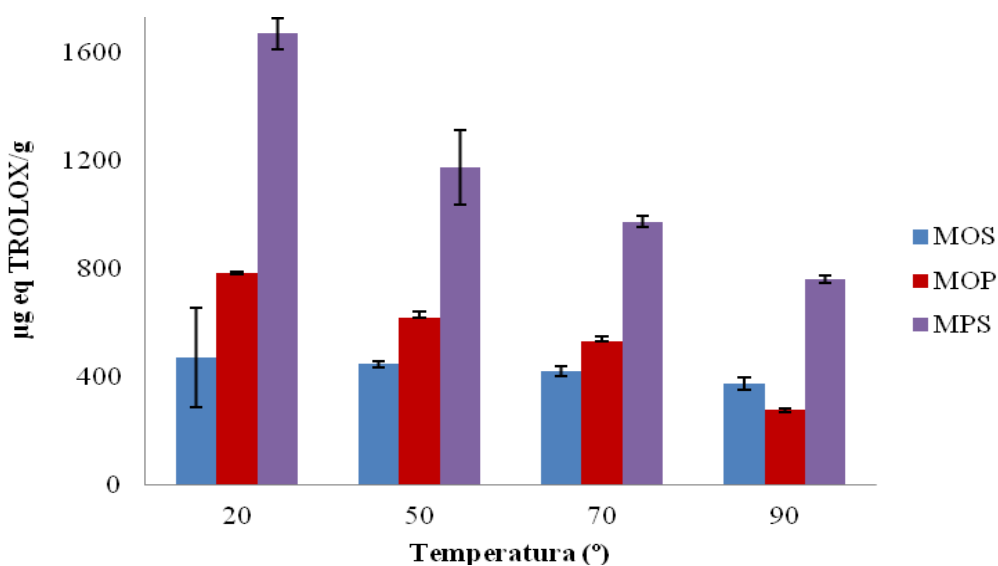


Figura R19. Capacidad antirradicalaria de las setas *Marasmius oreades* (sombbrero y pie) y *Macrolepiota procera* (sombbrero) según el método de DPPH tras una degradación durante 30' a diferentes temperaturas. En el eje de ordenados encontramos los microgramos equivalentes de Trolox/ gramo de seta.

4.6. Resultados para la muestra de la seta *Lactarius deliciosus*

4.6.1. Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los componentes fenólicos

Los extractos crudos de la seta se sometieron a incubación en baños de agua hirviendo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos).

Tabla R11. Fenoles totales en la seta *Lactarius deliciosus* (sombbrero y pie). Valores de la degradación a 90°C expresada en microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Fenoles totales: μg equivalentes ácido gálico/g de peso (% degradación)		
Tiempo (min)	LD Sombbrero	LD Pie
0	573 \pm 39 (100 \pm 0)	477 \pm 18 (100 \pm 0)
15	434 \pm 12 (76 \pm 2)	452 \pm 14 (95 \pm 3)
30	431 \pm 22 (73 \pm 2)	363 \pm 11 (76 \pm 2)
60	345 \pm 12 (60 \pm 2)	322 \pm 7 (67 \pm 2)
90	168 \pm 5 (29 \pm 1)	211 \pm 7 (44 \pm 2)
120	97 \pm 2 (17 \pm 1)	146 \pm 3 (31 \pm 1)

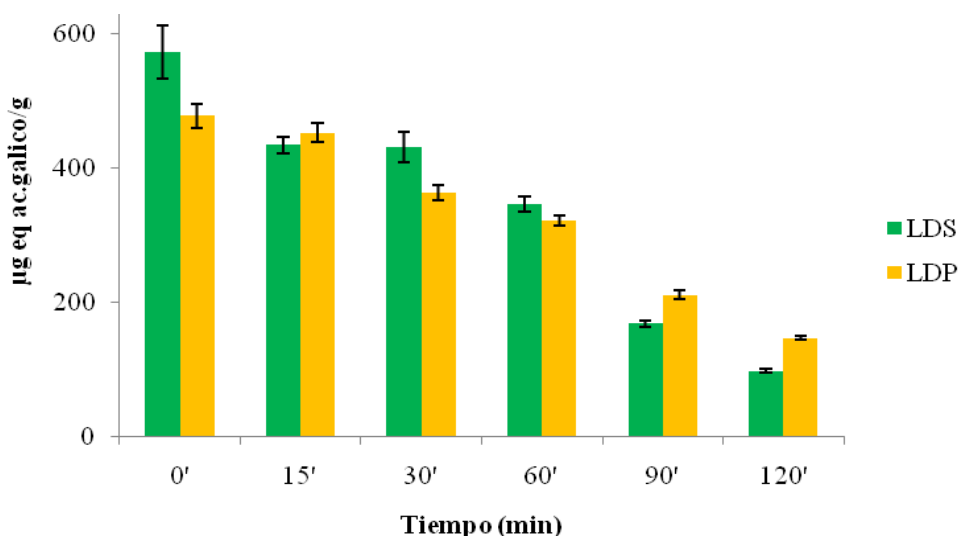


Figura R20. Fenoles totales en la seta *Lactarius deliciosus* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°C. En el eje de ordenadas representamos los microgramos de ácido gálico/ gramo de seta.

La pérdida más notable en los fenoles totales se produce entre 30 y 60 minutos de incubación a 90°, en contraste la actividad antioxidante cae bruscamente a los 30 minutos de incubación. En esta seta se puede apreciar que la termosensibilidad del sombrero es superior a la del pie.



Figura R21. Método de CUPRAC. Las tres setas se someten a una degradación de 30 minutos a una temperatura de 20°C.

Tabla R12. Capacidad antioxidante en la seta *Lactarius deliciosus* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°C expresada en microgramos (µg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Tiempo (min)	Capacidad antioxidante: (% degradación)	
	LD Sombrero	LD Pie
0	92 ± 2 (100 ± 0)	63 ± 3 (100 ± 1)
15	81 ± 5 (88 ± 6)	50 ± 1 (78 ± 1)
30	56 ± 2 (61 ± 2)	43 ± 4 (73 ± 6)
60	30 ± 3 (33 ± 3)	39 ± 2 (61 ± 3)
90	4 ± 1 (5 ± 1)	16 ± 3 (25 ± 4)
120	2 ± 1 (2 ± 1)	4 ± 2 (6 ± 2)

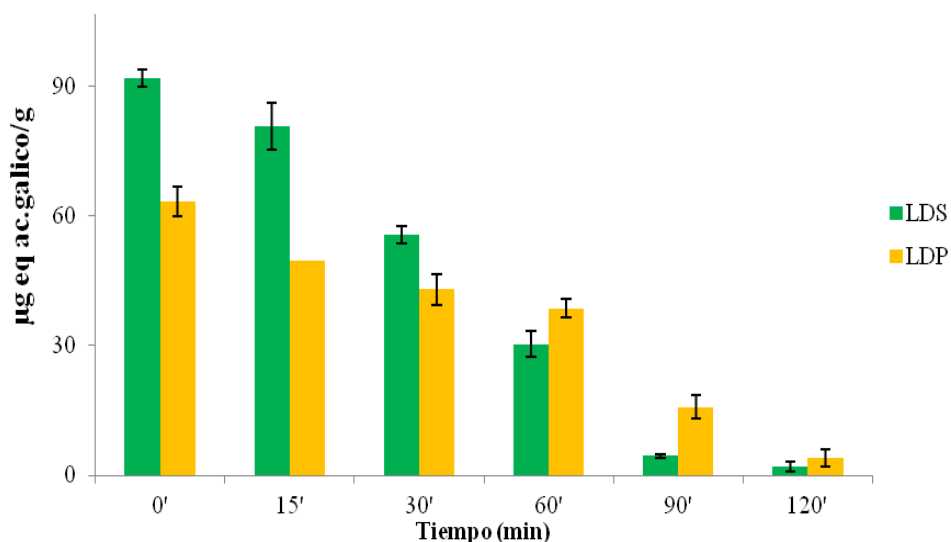


Figura R22. Capacidad antioxidante en la seta *Lactarius deliciosus* (sombbrero y pie). Valores de la degradación a 90°C. En el eje de ordenadas tenemos los microgramos de ácido gálico/ gramos seta y en el de abscisas el tiempo.

4.6.2. Medida de la degradación de los compuestos fenólicos a diferentes temperaturas (20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos.

Tabla R13. Fenoles totales en la seta *Lactarius deliciosus* (sombbrero y pie). Valores de la degradación durante 30' expresada en microgramos (µg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación

Fenoles totales: tiempo 30'		
µg equivalentes ácido gálico/g de peso		
(% degradación)		
T ^a (°C)	LD Sombbrero	LD Pie
20	533 ± 30 (100 ± 0)	437 ± 41 (100 ± 0)
50	491 ± 45 (92 ± 8)	399 ± 40 (91 ± 9)
70	4345 ± 13 (81 ± 2)	354 ± 31 (81 ± 7)
90	386 ± 21 (72 ± 4)	292 ± 15 (67 ± 3)

4. RESULTADOS

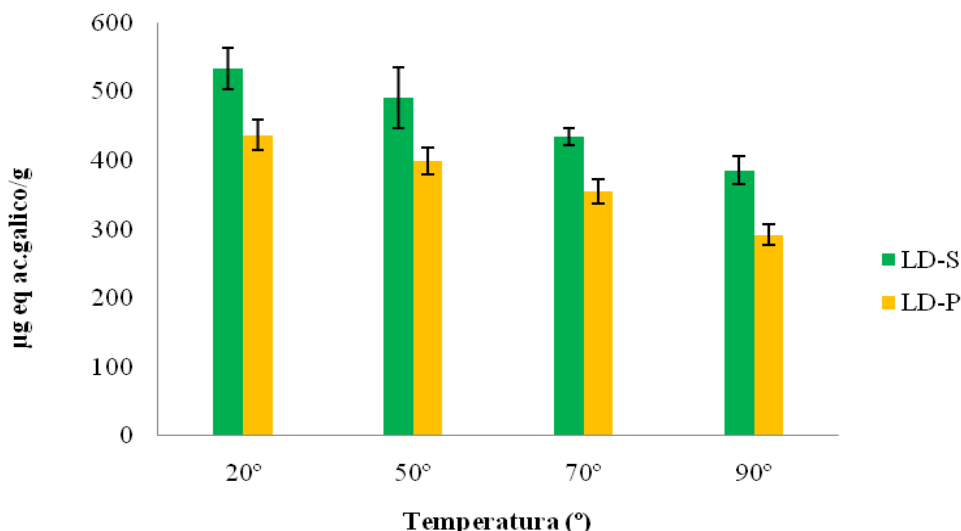


Figura R23. Fenoles totales en la seta *Lactarius deliciosus* (sombrero y pie). Valores de la degradación durante 30'. En el eje de ordenadas tenemos los microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de seta y en el de abscisas la T^a ($^{\circ}\text{C}$).

Tabla R14. Capacidad antioxidante en la seta *Lactarius deliciosus* (sombrero y pie) mediante el método de CUPRAC. Valores de la degradación durante 30' expresada en microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Capacidad antioxidante: tiempo 30'		
µg equivalentes ácido gálico/g de peso		
(% degradación)		
T^a ($^{\circ}\text{C}$)	LD Sombrero	LD Pie
20	105 ± 9 (100 ± 0)	75 ± 4 (100 ± 0)
50	79 ± 8 (76 ± 7)	66 ± 7 (89 ± 9)
70	72 ± 3 (69 ± 3)	50 ± 1 (67 ± 2)
90	69 ± 6 (66 ± 6)	47 ± 4 (62 ± 6)

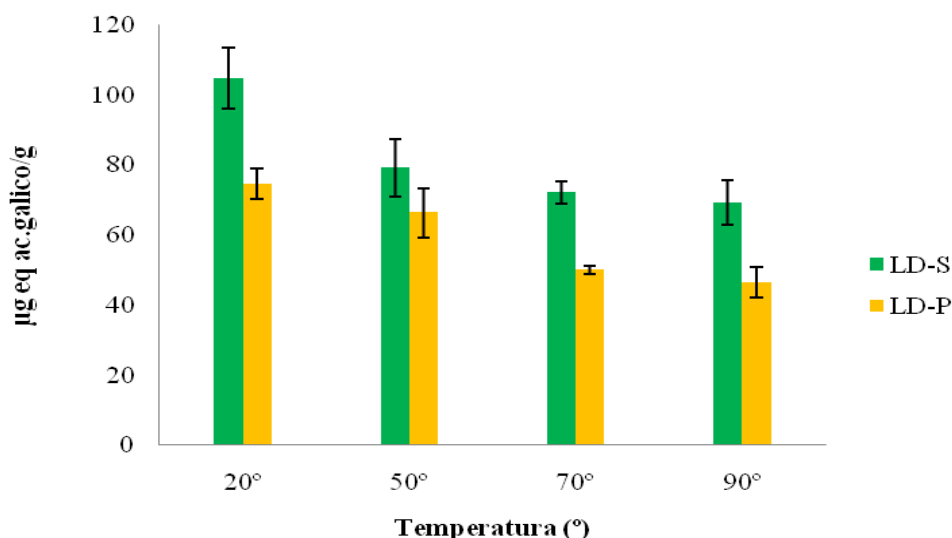


Figura R24. Capacidad antioxidante en la seta *Lactarius deliciosus* (sommbrero y pie) tras su degradación durante 30'. En el eje de las ordenadas tenemos microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de peso y en abcisas, la temperatura.

4.7 Resultados para la muestra de la seta *Macrolepiota procera*

4.7.1 Medida de la degradación por temperatura a 90°C y a diferentes tiempos de los componentes fenólicos.

Los extractos crudos de la seta se sometieron a incubación en baños de agua hirviendo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos).

Como se indica en la Tabla R15 y Figura R25, la pérdida por calor de los polifenoles y la actividad antioxidante es muy importante y se produce de manera progresiva ya desde los 30 minutos de incubación. En esta seta se aprecia todavía mejor la termosensibilidad de fenoles totales y actividad antioxidante del sommbrero que es mayor que la del pie.

Tabla R15. Fenoles totales en la seta *Macrolepiota procera* (sombrero y pie). Valores de la degradación a 90°. Los fenoles totales se expresan en microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación.

Fenoles totales: μg equivalentes ácido gálico/g de peso (% degradación)		
Tiempo (min)	MP Sombrero	MP Pie
0	2159 \pm 146 (100 \pm 0)	598 \pm 50 (100 \pm 0)
15	1993 \pm 26 (92 \pm 1)	598 \pm 6 (95 \pm 1)
30	1674 \pm 44 (78 \pm 1)	483 \pm 22 (82 \pm 1)
60	1120 \pm 197 (52 \pm 9)	486 \pm 22 (81 \pm 4)
90	844 \pm 12 (39 \pm 1)	256 \pm 3 (43 \pm 1)
120	373 \pm 2 (17 \pm 1)	197 \pm 5 (33 \pm 1)

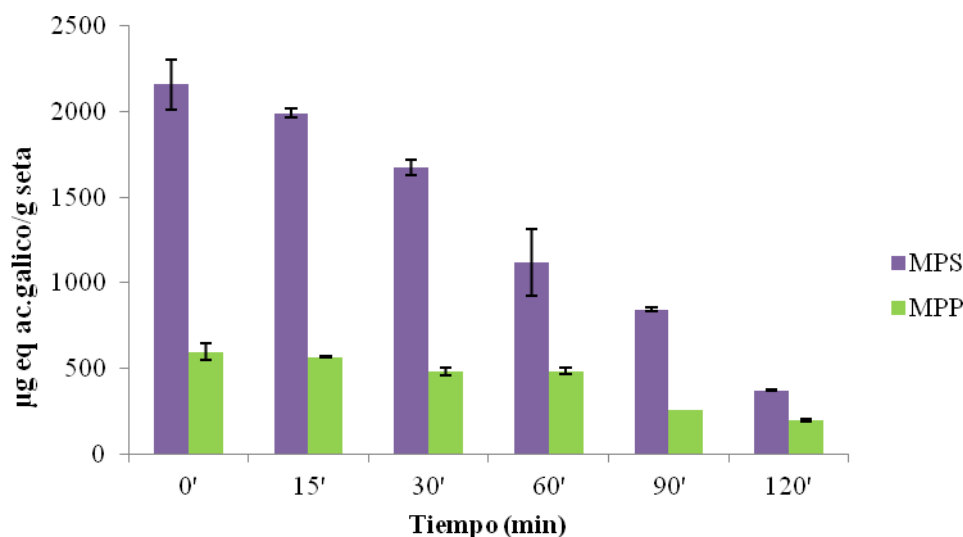


Figura R25. Fenoles totales en la seta *Macrolepiota procera* (sombrero y pie) tras su degradación a 90°. En el eje de ordenadas tenemos microgramos (μg) equivalentes ácido gálico/g de peso y el tiempo en el de abscisas.

Tabla R16. Capacidad antioxidante de la seta *Macrolepiota procera* mediante el método de CUPRAC tras la degradación a 90°C. La capacidad antioxidante se expresa en microgramos equivalentes de ácido gálico/ g de peso seta. En paréntesis expresamos la capacidad antioxidante como % de degradación.

Capacidad antioxidante: μg equivalentes ácido gálico/g de peso (% degradación)		
Tiempo (min)	MP Sombrero	MP Pie
0	587 ± 89 (100 ± 0)	138 ± 6 (100 ± 0)
15	568 ± 7 (97 ± 1)	112 ± 1 (81 ± 1)
30	374 ± 5 (64 ± 1)	82 ± 1 (59 ± 1)
60	295 ± 8 (50 ± 1)	63 ± 1 (45 ± 1)
90	141 ± 2 (24 ± 1)	24 ± 2 (17 ± 2)
120	52 ± 3 (9 ± 1)	6 ± 3 (5 ± 2)

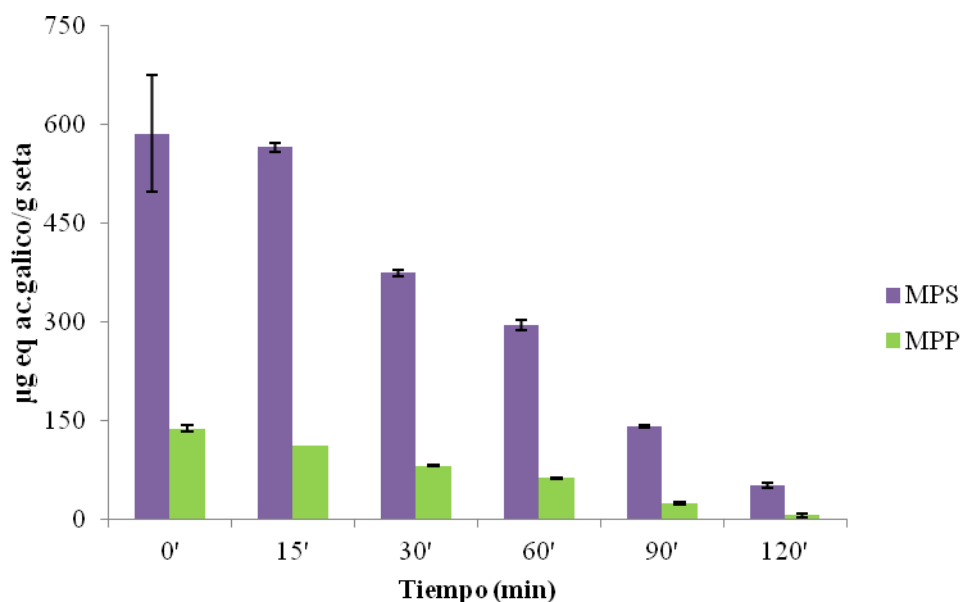


Figura R26. Capacidad antioxidante de la seta *Macrolepiota procera* mediante el método de CUPRAC tras la degradación a 90°C.

4.7.2. Medida de la degradación de los componentes fenólicos a diferentes temperaturas (20°C, 50°C, 70°C y 90°C) en un tiempo de 30 minutos.

Los datos obtenidos en los estudios de termosensibilidad a distintas temperatura indican, en el caso de *Macrolepiota procera*, que la mayor sensibilidad se produce a partir de los 70°C.



Figura R27. Método de Folin-Ciocalteu. Las tres setas se someten a una degradación a tiempo 30' a 50°C.

Tabla R17. Fenoles totales en la seta *Macrolepiota procera* (sombrero y pie) mediante el método de Folin-Ciocalteu. Valores de la degradación durante 30'. Los fenoles totales se expresan en microgramos (µg) equivalentes ácido gálico/g de peso. En paréntesis aparecen los valores en % de degradación

Fenoles totales: tiempo 30'		
µg equivalentes ácido gálico/g de peso		
(% degradación)		
Tª (°C)	MP Sombrero	MP Pie
20	2598 ± 420 (100 ± 0)	603 ± 129 (100 ± 0)
50	2341 ± 245 (90 ± 9)	568 ± 130 (94 ± 22)
70	1903 ± 139 (80 ± 14)	456 ± 17 (76 ± 3)
90	1292 ± 45 (50 ± 2)	348 ± 16 (58 ± 3)

4. RESULTADOS

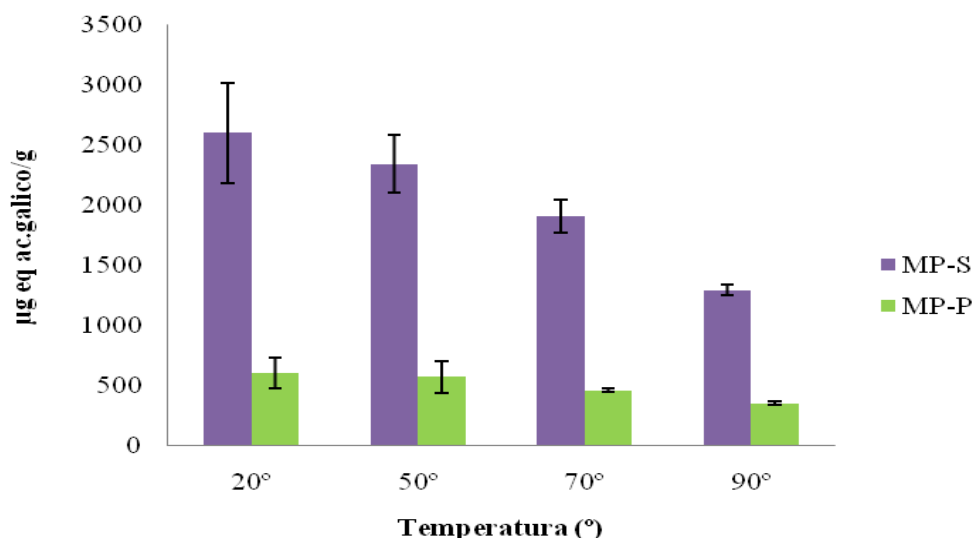


Figura R28. Fenoles totales en la seta *Macrolepiota procera* (sombrero y pie) tras su degradación durante 30' a diferentes temperaturas.

Tabla R18. Capacidad antioxidante de la seta *Macrolepiota procera* mediante el método de CUPRAC tras una degradación durante 30'. La capacidad antioxidante se expresa como microgramos equivalentes de ácido gálico/g de peso seco. En paréntesis expresamos la capacidad antioxidante como % de degradación.

Capacidad antioxidante: tiempo 30'		
µg equivalentes ácido gálico/g de peso		
(% degradación)		
T ^a (°C)	MP Sombrero	MP Pie
20	588 ± 54 (100 ± 0)	141 ± 12 (100 ± 0)
50	550 ± 19 (90 ± 9)	128 ± 6 (94 ± 22)
70	447 ± 20 (80 ± 14)	119 ± 4 (76 ± 3)
90	391 ± 6 (50 ± 2)	84 ± 5 (58 ± 3)

4. RESULTADOS

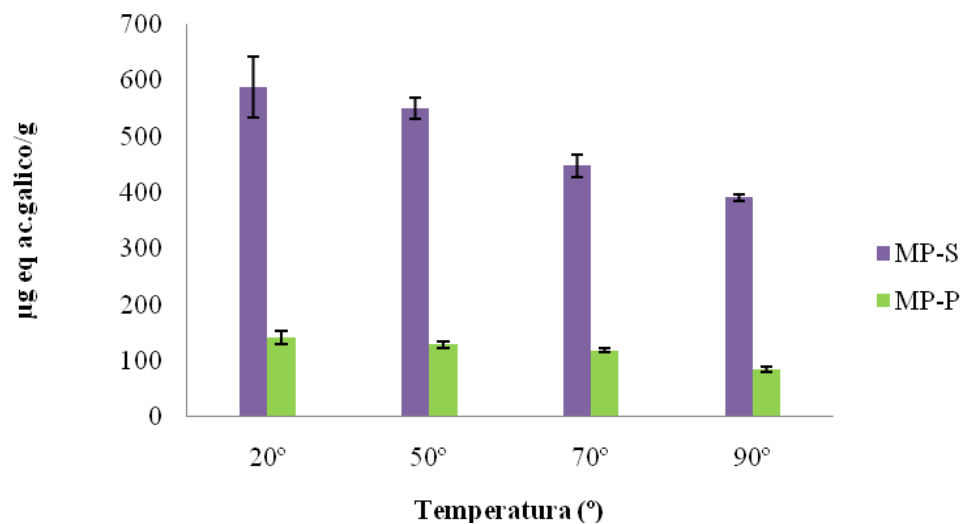


Figura R29. Capacidad antioxidante de la seta *Macrolepiota procera* mediante el método de CUPRAC tras una degradación durante 30'.

5. DISCUSIÓN

Los polifenoles poseen gran capacidad antioxidante y antirradicalaria y por ello las setas comestibles se consideran como una fuente de actividad antioxidante reseñable.

Las tres setas comestibles estudiadas en el presente trabajo contienen gran cantidad de fenoles, en particular destaca *Macrolepiota procera*, seguida muy de cerca por *Marasmius oreades*, con gran cantidad de fenoles y alta actividad antioxidante y antirradicalaria. En general los sombreros contienen mayor concentración de fenoles y por lo tanto mayor actividad antioxidante.

Las setas comestibles suelen consumirse previa cocción por procedimientos que conllevan temperaturas cercanas a los 100⁰C. Ello es debido a que muchas, sino todas, las setas contienen sustancias que podrían considerarse antinutrientes y/o tóxicas. En muchos casos esta toxicidad desaparece mediante cocción pero en otros casos no. Si bien este proceso térmico puede inactivar sustancias indeseables puede afectar también a las sustancias bioactivas interesantes. Por ello se consideró que la incubación a estas temperaturas podría afectar al contenido de fenoles y a las capacidades antioxidantes y antirradicalarias.

Esto lo comprobamos con los resultados que se obtuvieron. Por ejemplo, los fenoles totales de la seta *Marasmius oreades* medidos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a 90° y 60' se degradan el 50% de los fenoles totales mientras que a 30' apenas se perdían el 30% de los fenoles totales. Por lo tanto hay que tener en cuenta que la cocción de éstas setas conlleva destrucción de sustancias fenólicas.

En cuanto a las actividades antioxidantes hemos encontrado que el proceso de cocción inactiva sustancialmente las moléculas responsables de

la actividad antioxidante, en su mayor parte polifenoles, y aunque no se han determinado aquí, tocoferoles y vitamina E.

Respecto a la capacidad antirradicalaria hay que destacar que el sombrero de macrolepiota procera es especialmente rico en sustancias con actividad antirradicalaria y que también presenta una termosensibilidad notable.

A la hora de tener en cuenta nuestros resultados, en el ámbito de la nutrición, las setas comestibles se ingieren en pequeñas cantidades, normalmente como acompañamiento de otros alimentos, en base a los aromas y sabores especiales que las caracterizan. Por ello, la contribución de las setas comestibles a la ingesta total de alimentos es reducida y por tanto la incorporación de las sustancias antioxidantes derivadas de ellas, aunque relevantes, también lo son.

Hay que resaltar que los valores obtenidos pueden variar en función de las zonas de recogida, estos ejemplares pertenecen a Castilla y León, con unas características bioclimáticas específicas, la composición del suelo y el procesamiento posterior a la recogida.

6. CONCLUSIONES

De los estudios realizados con las tres setas se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Las setas son diferentes tanto en su contenido polifenólico como en su actividad antioxidante y antirradicalaria.
2. De las setas estudiadas, *Macrolepiota procera* es la que más cantidad de fenoles totales contiene, especialmente en el sombrero, y mayor capacidad antioxidante y antirradicalaria.
3. Las tres setas presentan termosensibilidad en las condiciones utilizadas en tecnología culinaria, tanto en lo que respecta a fenoles totales como a capacidad antioxidante.
4. La pérdida de actividad antioxidante por cocción es de tal relevancia que debe tomarse en cuenta si lo que se busca es la ingesta de suplementos antioxidantes de setas comestibles.

7. BIBLIOGRAFÍA

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Ozyürek, M., Celik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., et al. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1496–547.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1076–9.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25–30.

Chang ST, Wasser SP. (2012) The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms*. 14(2):95-134.

De Diego Calonge, F. (2011). *Hongos medicinales*. Editorial Mundi-Prensa.

Diplock, a T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., et al. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *The British journal of nutrition*, 80 Suppl 1, S77–112.

Girbés, T., Jiménez, P. (2010). *Cuaderno de Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Girbés, T., Jiménez, P. (2012). Nutrición y envejecimiento. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*. 49, 32-43.

Gómez Urrutia J. (2006). *Boletín Micológico FAMCAL N°1*. Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León

Gucia, M., Jarzyńska, G., Rafał, E., Roszak, M., Kojta, A. K., Osiej, I., & Falandysz, J. (2012). Multivariate analysis of mineral constituents of edible Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) and soils beneath fruiting bodies collected from Northern Poland. *Environmental science and pollution research international*, 19(2), 416–31.

Halliwell, B., Aeschbach R., Löliger J., Aruoma OI. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 33(7), 601-17.

Huang D, Ou B & Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 1841–56

Jiménez, P; Cabrero, P; Basterrechea, J.E; Tejero, T; Córdoba Díaz, D; Córdoba-Díaz, M; and Tomas Girbés. Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Plant Foods for Human Nutrition.* (2014).

Jiménez, P; Girbés, T. (2013). Tesis Doctoral Basterrechea, J.E. "Capacidad antioxidante y antirradicalaria , y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano (*Sambucus ebulus* L.)".

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. (2006). Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res.* (11), 961-965).

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290-4302

Reis, F. S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules* (Basel, Switzerland), 16(6), 4328–38.

Robaszkiewicz, a, Bartosz, G., Lawrynowicz, M., & Soszyński, M. (2010). The Role of Polyphenols, β -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms. *Journal of nutrition and metabolism*, 2010, 173274.

Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol Nutr Food Res.* 51(12), 1461-71.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.

Soler-Rivas, C., Ramírez-Anguiano, A. C., Reglero, G. and Santoyo, S. (2009), Effect of cooking, *in vitro* digestion and Caco-2 cells absorption on the radical scavenging activities of edible mushrooms. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 2189–2197.

Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (3)144-158.

Wang, S. Y., Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10), 4977–4982.